苜蓿夜蛾中肠丝氨酸蛋白酶 cDNA 的克隆、序列分析及原核表达

周晓群，高艳玲，赵奎军，樊　东*

（东北农业大学农学院，哈尔滨 150030）

摘要:【目的】本研究旨在从苜蓿夜蛾 *Heliothis viriplaca* 中肠克隆出丝氨酸蛋白酶(serine protease, SP)基因的 cDNA 序列,测定原核表达后的蛋白经纯化及复性后的活性。【方法】运用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增方法(rapid amplification of cDNA ends, RACE)克隆苜蓿夜蛾幼虫中肠丝氨酸蛋白酶 cDNA 全序列,用大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达系统进行表达。重组蛋白经纯化后,利用梯度透析法进行复性,以 BApNA 为底物,进行活性测定。【结果】克隆获得的苜蓿夜蛾中肠丝氨酸蛋白酶基因命名为 *HvSP*(GenBank 登录号:JX866720),该基因全长 880 bp,开放阅读框长 762 bp,编码 254 个氨基酸,推测分子量和 pI 值分别为 26.9 kDa 和 9.49。由 *HvSP* 推导的氨基酸与鳞翅目昆虫 SP 氨基酸序列的一致性在 52% ~95% 之间,其中与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* SP(GenBank 登录号:CAA72962)的氨基酸序列一致性最高,达 95%。成功构建重组载体 pET21b-*HvSP* 进行原核表达,Western-blot 鉴定确定为目的蛋白。蛋白可溶性分析发现重组蛋白为包涵体。在 Glycine-NaOH 缓冲液中,当 pH 为 10.0 时,复性的重组蛋白活性达到最高,为 35.74 U/mL。【结论】本研究在苜蓿夜蛾体内获得了一个新的丝氨酸蛋白酶基因,且原核表达后的重组蛋白经过变性、纯化及复性后具有活性。该结果为进一步研究丝氨酸蛋白酶在鳞翅目昆虫体内的生理功能奠定了基础。

关键词: 苜蓿夜蛾; 丝氨酸蛋白酶; cDNA 克隆; 原核表达; 重组蛋白; 酶活性

中图分类号: Q966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2014)09-1008-10

cDNA cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of a serine protease from the midgut of *Heliothis viriplaca* (Lepidoptera: Noctuidae)

ZHOU Xiao-Qun, GAO Yan-Ling, ZHAO Kui-Jun, FAN Dong* (College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract:【Aim】This study aims to obtain the full-length cDNA sequence of serine protease (SP) from the midgut of *Heliothis viriplaca* and determine the activity of SP expressed in prokaryotic expression system after purification and renaturation process.【Methods】The full-length cDNA sequence of SP was amplified from the midgut of larval *H. viriplaca* by RT-PCR and RACE technique, and then the cDNA sequence was expressed in *Escherichia coli* expression system. After being purified, the recombinant protein was renatured using gradient dialysis technique. The activity of renatured protein was determined with BApNA as the substrate.【Results】The cloned SP cDNA sequence from the midgut of *H. viriplaca* was named as *HvSP* (GenBank accession no.: JX866720). The full-length cDNA sequence of *HvSP* is 880 bp in length with an open reading frame of 762 bp, encoding 254 amino acid residues with the predicted molecular weight of 26.9 kDa and pI of 9.49. Multiple sequence alignment indicated that HvSP shares 52% -95% amino acid sequence identities with SPs from other lepidopteran insects, and shares the highest amino acid sequence identity (95%) with SP from *Helicoverpa armigera* (GenBank accession no.: CAA72962). The recombinant vector pET21b-*HvSP* was expressed in prokaryotic expression system, and the recombinant protein was determined as the target protein using Western-blot analysis. Protein solubility analysis indicated that the recombinant protein was inclusion body protein. The renatured recombinant protein had the highest activity (35.74 U/mL) when the pH was 10.0 in Glycine-NaOH buffer.【Conclusion】A novel serine protease cDNA sequence was obtained from *H. viriplaca*, and

---

基金项目: 黑龙江省自然科学基金(C201415)

作者简介: 周晓群, 男, 1988 年 12 月出生, 陕西汉中人, 硕士研究生, 主要从事昆虫生物化学和分子生物学研究, E-mail: zxq20083888@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: dnfd@163.com

收稿日期 Received: 2014-05-29; 接受日期 Accepted: 2014-08-06

recombinant protein expressed in *E. coli* expression system was active after denaturation, purification and renaturation processes. The results provide a foundation for further research of physiological function of serine protease in lepidopteran insects.

Key words: *Heliothis viriplaca*; serine protease; cDNA cloning; prokaryotic expression; recombinant protein; enzyme activity

丝氨酸蛋白酶(serine proteases, SPs)是一类以丝氨酸为活性中心的重要蛋白水解酶。根据其靶标切开位点的不同,主要分为胰蛋白酶(trypsin)和胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)两大类(Brackney *et al*., 2010)。在不同昆虫的消化酶中,胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶所占的比列不同,如在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的消化酶中,胰蛋白酶占 90%,而胰凝乳蛋白酶仅占 5%;在斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 中,胰凝乳蛋白酶占 85%,而胰蛋白酶仅占 7%(Srinivasan *et al*.,2006)。在昆虫中,丝氨酸蛋白酶主要参与消化、发育、先天免疫反应和组织重建等重要的生理过程(Johnston *et al*., 1991; Christeller *et al*., 1992; Lehane *et al*., 1998; Kotani *et al*.,1999;Choo *et al*.,2011)。在过去的几十年内,国内外学者已经分别从多种鳞翅目昆虫如烟草天蛾 *Manduca sexta*、棉铃虫、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、欧洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 等体内克隆得到多条丝氨酸蛋白酶基因的 cDNA 序列,经鉴定其产物主要为胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶,并且对它们的功能也作了较为详尽的研究,结果证明丝氨酸蛋白酶在鳞翅目昆虫体内也主要参与上述功能(Peterson *et al*.,1995; Herrero *et al*.,2005;Srinivasan *et al*., 2005;Coates *et al*.,2006; Broehan *et al*.,2008,2010; Zhang *et al*., 2010; Zhan *et al*.,2011;Xie *et al*.,2012;Zhu *et al*., 2012;Shi *et al*.,2013)。

目前,大部分昆虫丝氨酸蛋白酶基因的异源表达已经成为现实,但如何快速经济得到大量有活性的丝氨酸蛋白酶一直是研究中的一个难点。Herrero 等(2005)从甜菜夜蛾体内克隆得到一条胰凝乳蛋白酶基因,并且在昆虫细胞表达系统 Sf21 中成功表达,活性测定表明它对 pH 敏感,这是首次在异源表达系统中表达得到有活性的丝氨酸蛋白酶。刘海明等(2012)从华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* 中肠克隆得到一条丝氨酸蛋白酶基因,在原核表达系统表达后发现蛋白主要为包涵体,经酶活性测定,未发现有丝氨酸蛋白酶活性,但并没有对包涵体进行复性探索测定其活性。为此本研究以苜蓿夜蛾 *Heliothis viriplaca* 为材料,克隆其中肠丝氨酸蛋白酶基因,实现其在原核表达系统的表达。表达的融合蛋白进行变性、纯化与复性,并以 BApNA 为底物进行活性测定。研究结果为进一步探索丝氨酸蛋白酶在鳞翅目昆虫体内的生理功能奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

苜蓿夜蛾成虫采自东北农业大学香坊试验基地,在实验室以 5% 蜂蜜水饲喂,待其产卵;幼虫孵化后,在 26 ± 1℃,相对湿度为 70% 和光周期为 14L∶10D的培养箱内用大豆叶饲养至 5 龄幼虫备用。

1.2　主要试剂

RNA 提取 TRIzol® Reagent 购自 Invitrogen 公司;反转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase、低熔点琼脂糖购自 Promega 公司;DL2000 DNA Marker、DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、Taq DNA 聚合酶和限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Hin*d Ⅲ 购自 TaKaRa 公司;pEasy-T_1 克隆载体、蛋白 Marker 和 Ni-NTA 亲和层析柱购自北京全式金生物有限公司;大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α、BL21 和 pET21b 质粒由本实验室保存,其余试剂为进口或国产分析纯。Ni-NTA 柱平衡缓冲液:8 mol/L 尿素、100 mmol/L NaH_2PO_4 和 10 mmol/L Tris base pH 8.0(同时为变性缓冲液和漂洗缓冲液);洗脱缓冲液 1 - 4:依次含有 80, 120, 160 和 200 mmol/L 咪唑的平衡缓冲液(pH 8.0);复性缓冲液 1 - 5:依次含有 8, 6, 4, 2 和 0.5 mol/L尿素的 100 mmol/L NaH_2PO_4, 10 mmol/L Tris base, 0.4 mol/L 精氨酸, 5 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽和 5% 蔗糖(pH 8.0);复性缓冲液 6: 30 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)。

1.3　中肠 RNA 的提取与第一链 cDNA 的合成

选取苜蓿夜蛾 5 龄取食期第 2 天幼虫,在 RNA 保存液中解剖得到中肠,采用传统 Trizol 萃取法提取中肠总 RNA,每 100 mg 组织加入 1 mL TRIzol®

Reagent。提取的总 RNA 用紫外分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的纯度和完整度,放入 -80℃冰箱中备用。以 dt-Ro-Ri 为 cDNA 合成引物(表 1),按照反转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书方法,合成第一链 cDNA,保存于 -20℃。

1.4 引物设计

根据 NCBI GenBank 上已登录的棉铃虫(登录号:HM209426)和烟芽夜蛾(登录号:EF531631)两种鳞翅目夜蛾科昆虫基因的全序列设计克隆苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶特异片段的简并引物 SP-F 和 SP-R。根据得到的特异片段 cDNA 序列设计 2 个克隆基因 3′端的引物 SP-3′Ro 和 SP-3′Ri;利用 TaKaRa 5′-Full RACE Kit,在已得到的基因片段中根据试剂盒中的 5′-RACE Outer Primer 和 5′-RACE Inner Primer 分别设计引物 SP-5′Ro 和 SP-5′Ri。根据拼接得到的基因全长序列,在 ORF 两侧设计引物 SP-QF 和 SP-QR。根据克隆得到的丝氨酸蛋白酶基因序列,设计带有酶切位点的表达引物 SP(BD)-F 和 SP(BD)-R。引物合成由上海生工生物有限公司完成。引物名称及具体用途见表 1。

表 1 引物序列列表

Table 1 List of the primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	引物用途 Usage of primers
dt-Ro-Ri	ATCGATGGTCGACGCATGCGGATCCAAAGCTTGAATTC GAGCTC(T)$_{17}$	第一链 cDNA 的合成 Synthesis of the 1st strand cDNA
SP-F	CTGTCGCAGCTGTCCCCAG	特异片段克隆
SP-R	GTGTAGCGGGATACGCGAGC	Fragment cloning
Ro	ATCGATGGTCGACGCATGCGGATCC	5′ 端和 3′ 端扩增
Ri	GGATCCAAAGCTTGAATTCGAGCTCT	5′ end and 3′ end amplification
SP-3′Ro	GGCCCTCTCTACCACAACGGCATC	
SP-3′Ri	GGTGTCTGCTCCTTCGGTATTGG	
5′RACE Outer Primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	
5′RACE Inner Primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	
SP-5′Ro	ACTGCCAGTAGGCGCTCAAGTT	
SP-5′Ri	CGATCAATAGTAGTTACCGAACCACCCAC	
SP-QF	ATGCGTATCCTTGCTCTGCT	全长序列克隆
SP-QR	GCGTTAGATGAGATCCAAGAGG	Full-length sequence cloning
SP(BD)-F	CCGGAATTCAGTCCCCAGCAATCCCCA	重组表达
SP(BD)-R	CCCAAGCTTGGCGTTAGAAGAGATCCAAGAAGG	Recombinant expression

1.5 丝氨酸蛋白酶基因片段的获得和 cDNA 5′末端和 3′末端序列的获得

以合成的第一链 cDNA 为模板,利用 SP-F 和 SP-R 引物(表 1)扩增苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶 cDNA 序列的特异片段。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s, 52℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃延伸 10 min。反应结束后,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,成功后进行纯化,并与 pEasy-T1 载体连接,连接产物转化 *E. coli* DH5α,菌落在含有氨苄青霉素的 LB 固体平板上进行抗性筛选,对阳性克隆菌株进行酶切和 PCR 鉴定,将连接正确的重组质粒由博士生物公司进行序列测定。

根据上述得到的 cDNA 序列,利用引物 SP-3′Ro 和 SP-3′Ri 与引物 Ro 和 Ri 扩增序列的 3′端(表 1)。首轮 PCR 引物为 SP-3′Ro 和 Ro,取首轮扩增产物以 SP-3′Ri 和 Ri 为引物进行第 2 轮扩增。利用 TaKaRa5′-Full RACE Kit 试剂盒中的 5′-RACE Outer Primer 和 5′-RACE Inner Primer 与引物 SP-5′Ro 和 SP-5′Ri(表 1),按照试剂盒说明书进行 5′RACE 扩增。PCR 产物的检测、回收、连接、转化和测序均和中间片段扩增方法一致。将上述克隆得到的目的片段,测序鉴定正确后进行拼接得到基因的全序列,利用引物 SP-QF 和 SP-QR(表 1)进行基因全长验证以确认其准确性。

1.6 序列分析及进化树构建

使用 DNAMAN 软件进行 ORF 预测及蛋白质翻译;使用蛋白组学在线 ExPASy 网站(http://www.expasy.org/tools/)的 Compute pI/Mw 推导氨基酸序列的分子量、等电点,SignalP 4.1 Server 进行信号肽的预测,Prosite 软件进行结构域分析;运用 NCBI

BLAST 对本实验获得基因推导的氨基酸序列进行同源性搜索；使用 ClustalX 和 MEGA 软件进行同源性比较和系统进化分析，采用 Neighbor-Joining（NJ）法构建系统进化树。

1.7 原核表达载体 pET21b-*HvSP* 的构建

利用引物 SP（BD）-F 和 SP（BD）-R（表 1）扩增基因的编码区；琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物后，回收目的片段与 pEasy-T_1 载体连接，连接产物转化 *E. coli* DH5α，筛选出阳性克隆，利用质粒提取试剂盒提取重组质粒，利用 *Hin*dⅢ 和 *Eco*RⅠ 酶切重组质粒，回收基因片段，与同样经过酶切的质粒载体 pET21b 连接，转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞，挑选阳性克隆，提取重组质粒进行 *Hin*dⅢ/ *Eco*RⅠ 单酶切、双酶切鉴定分析。将单、双酶切鉴定成功的阳性质粒送到博士生物公司测序。

1.8 重组蛋白的原核表达及 Western-blot 验证

挑选正确的重组质粒 pET21b-*HvSP* 转化到大肠杆菌菌株 *E. coli* BL21 中，选取阳性菌株接种于 5 mL LB（含有 100 μg/mL amp）液体培养基中，37℃ 220 r/min 振荡培养过夜；取 1 mL 菌液接种于 100 mL LB（含有 100 μg/mL amp）液体培养基中，37℃ 220 r/min 振荡培养至 OD 值为 0.6，加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG（24 mg/μL）进行诱导表达，37℃ 220 r/min 继续振荡培养 6 h。取 1 mL 菌液至离心管中，室温 12 000 r/min 离心 2 min，弃上清，沉淀重悬于 150 μL 的 1 × 蛋白上样缓冲液中，煮沸 10 min，室温 12 000 r/min 离心 1 min，取 15 μL 上清进行 SDS-PAGE（12% 分离胶和 4% 浓缩胶），检测蛋白的表达。

将重组蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜，用杂交膜清洗液 TBS 洗涤后，以配制好的封闭液进行孵育。将一抗（His-tag 抗体）、抗体反应液 HRP（鼠）及抗体稀释液混合而成的抗体孵育液加至膜上，于摇床上以适当速度孵育 40 min，经洗涤后，加底物 DAB 显色，拍照。

1.9 重组蛋白的变性、纯化与复性

将上述诱导表达 6 h 后的培养物收集于 50 mL 的离心管中，4℃ 12 000 r/min 离心 10 min，加入 20 mL 0.1 mol/L 的 Tris-HCl（pH 8.0），把离心管放在冰浴中进行超声破碎。破碎 5 s，停止 5 s，反复此步骤共进行 10 min。4℃ 12 000 r/min 离心 10 min，分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE，分析目的蛋白的可溶性。在包涵体中加入变性缓冲液变性处理后，参照 Ni-NTA 亲和层析柱说明书纯化带 His-tag 的目的蛋白。用洗脱缓冲液 1 – 4 洗脱目的蛋白后进行 SDS-PAGE 鉴定。

收集洗脱得到的目的蛋白，利用梯度透析法复性重组蛋白（包义风等，2012）。依次用复性缓冲液 1 – 5 过夜透析复性蛋白。最后用复性缓冲液 6 透析，得到经复性的重组蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.10 丝氨酸蛋白酶重组蛋白的活性测定

BApNA 以 20 mg/mL 溶于 DMSO，取 40 μL 分别加入到 0.5 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 6.0 ~ 9.5）和 0.1 mol/L Glycine-NaOH 缓冲液（pH 8.5 ~ 10.5）中，同时加入 0.5 mL 经复性的蛋白（对照中加入 0.5 mL 缓冲液）。反应 20 min 后，加入 0.5 mL 30%（v/v）乙酸终止反应。然后以对照组调零，在 405 nm 测光吸收值，重复 3 ~ 4 次（王琛柱等，1996）。丝氨酸蛋白酶活力单位的定义为：在一定条件下，以 BApNA 为底物，每分钟使 $\triangle A_{405}$ 增加 0.001的酶量为一个蛋白酶活力单位（U）。计算公式为：

$$酶活力(U/mL) = \frac{\Delta A_{405}/min}{0.001 \times 酶液加入体积} \times 稀释倍数。$$

1.11 数据统计与分析

丝氨酸蛋白酶活性测定数据用 SPSS17.0 进行统计分析，数值以平均值 ± 标准差（*SD*）表示，显著性差异分析使用 Duncan 氏多重比较法检验（P = 0.05）。

2 结果与分析

2.1 苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶基因的克隆与序列分析

本研究从苜蓿夜蛾 5 龄幼虫中肠克隆得到一个新的丝氨酸蛋白酶基因，命名为 *HvSP*（GenBank 登录号：JX866720）。该基因长 880 bp，开放阅读框长 762 bp，编码 254 个氨基酸，含有 18 bp 和 100 bp 的 5′和 3′非编码区，N 端含有 16 个氨基酸组成的信号肽，在 polyA 末端上游有一个多聚腺苷酸终止信号序列 AATAAA（图 1）。由 *HvSP* 基因推导的蛋白质分子量为 26.9 kDa，等电点为 9.49。结构域分析表明，*HvSP* 基因翻译后的氨基酸序列具有明显的丝氨酸蛋白酶的典型特征，即氨基酸序列中具有保守的组氨酸（His）、天冬氨酸（Asp）和丝氨酸（Ser）残基组成酶活的催化中心三元件。而且蛋白质含有 3 对半胱氨酸残基，分别位于第 54 与 70 位、179 与 196 位、207 与 231 位，这 6 个保守的半胱氨酸残基组成 3 对二硫键，对于维持蛋白质的三级结构起着重要作用。

2.2　HvSP 与鳞翅目昆虫丝氨酸蛋白酶氨基酸序列比对及进化树构建

将 *HvSP* 推导出的氨基酸序列(GenBank 登录号:AGB93875)在 NCBI BLAST 上进行搜索,结果显示与鳞翅目昆虫丝氨酸蛋白酶的氨基酸序列一致性达到 52% ~95%,其中与棉铃虫 SP(GenBank 登录号:CAA72962)的氨基酸序列一致性最高,达 95%。将 HvSP 的氨基酸序列与 NCBI 上已知 15 种鳞翅目昆虫 SP 的氨基酸序列进行序列比对(图 2),结果显示,它们的氨基酸长度集中在 253 ~257 aa 之间,均含有丝氨酸蛋白酶的催化三联活性中心。AAHC,D 和 CQGDSGG 分别是这 16 种丝氨酸蛋白酶的组氨酸、天冬氨酸和丝氨酸的保守区域,均含有 IoGGS(o 表示该位置的氨基酸是可变的) 酶原转变为成熟酶的保守区域作用位点,其中 IVGGS 是苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶的酶原转变为成熟酶的作用位点。

应用 MEGA5.0 软件 NJ 法构建鳞翅目不同科昆虫的丝氨酸蛋白酶系统发育进化树(图3)。结果表明,苜蓿夜蛾(GenBank 登录号:AGB93875)与鳞翅目夜蛾科棉铃虫(GenBank 登录号:CAA72962)首先聚类,然后与烟芽夜蛾(GenBank 登录号:ABR88248)聚类,与鳞翅目非夜蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori*(GenBank 登录号:XP_004934280)、欧洲玉米螟(GenBank 登录号:AAX62034)、云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana*(GenBank 登录号:AAA84423)、小菜蛾(GenBank 登录号:AGR92345)等昆虫的遗传距离较远。

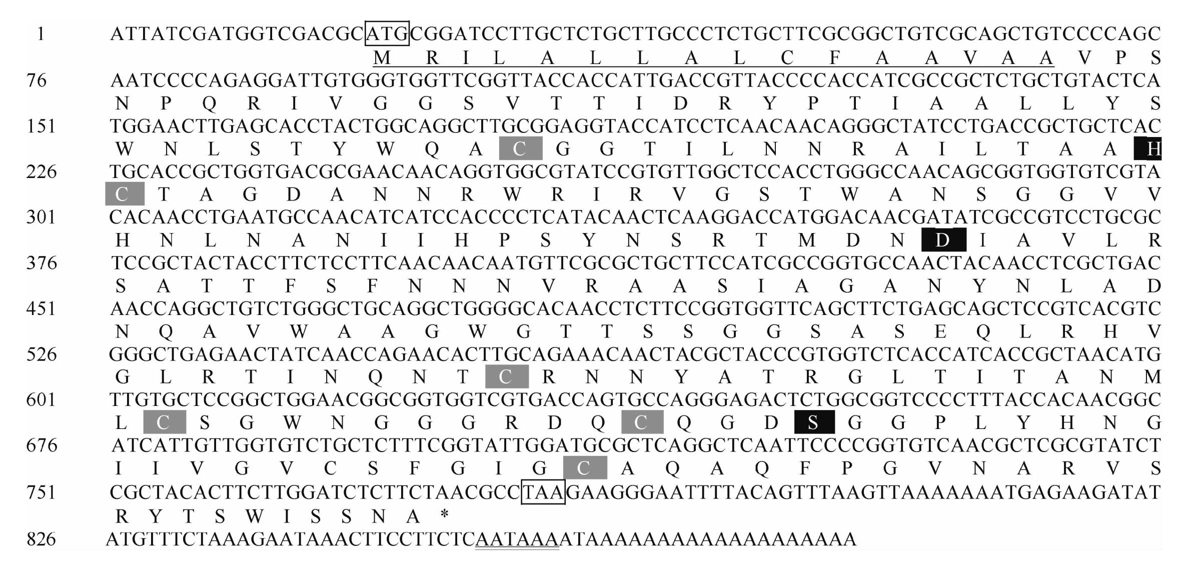


图 1　苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of serine protease cDNA from *Heliothis viriplaca*

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 加方框表示,信号肽用下划线标出,多聚腺苷酸信号 AATAAA 用双下划线标出,活性中心用黑色阴影表示,二硫键用灰色阴影表示。The initiation codon ATG and termination codon TAA are in solid box. The putative signal peptide is underlined. A putative polyadenylation site (AATAAA) is double underlined. The catalytic active sites are shaded black. Disulphide bond regions within the chitin-binding domains are shaded grey.

2.3　重组蛋白的诱导表达及 Western-blot 鉴定

目的菌株经 IPTG 诱导后,相对于 pET21b 空载体转化菌对照组,在相对分子质量接近 26.9 kDa 处,有一条明显的目的条带,而 pET21b 对照组没有相应的蛋白带出现(图 4: A)。将重组蛋白进行 Western-blot 分析,从图 4(B)可以看出明显的目的条带,说明融合蛋白与 His-tag 抗体发生特异性反应,证明 *HvSP* 基因已经在大肠杆菌表达系统中正确表达。

2.4　重组蛋白的可溶性分析

从图 4(A)可以看出,在相对分子质量接近 26.9 kDa处,上清中没有目的条带,而沉淀中明显有目的条带,说明在原核表达系统中表达的重组蛋白是一种包涵体蛋白,经酶活性测定,未发现有丝氨酸蛋白酶活性。

2.5　丝氨酸蛋白酶重组蛋白的纯化、复性和活性测定

经过变性后的重组蛋白,利用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化蛋白。从图 4(A)可以看出,含 160 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液可以把目的蛋白洗脱出来,而含 200 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液可以洗脱更多的目的蛋白,相对分子质量大小接近 26.9 kDa,证明获得了较高纯度的重组蛋白。利用梯度透析法对纯化后的蛋白进行复性,对复性后的重组蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定(图 4: A)。

丝氨酸蛋白酶重组蛋白的活性测定结果如图 5



图 2　苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶与其他已知昆虫丝氨酸蛋白酶氨基酸序列的多重比对

Fig. 2　Multiple alignment of amino acid sequence of serine protease from *Heliothis viriplaca* and its homologues from other insects

深蓝色背景表示一致性为 100%，粉色背景表示一致性大于等于 75%，浅蓝色背景表示一致性大于等于 50%。The dark blue shade indicates 100% identity, the pink shade indicates ≥75% identity, while the light blue shade indicate ≥50% identity.

97 *Heliothis virescens* ABR88242
62 *Heliothis virescens* AFO68322
Helicoverpa punctigera AFQ37934
66 64 *Helicoverpa armigera* ADI32886
Heliothis virescens ABR88248
42 18 *Helicoverpa armigera* CAA72962
67 **_Heliothis viriplaca_ AGB93875**
51 *Heliothis virescens* AAF43708
91 *Spodoptera litura* ABU96714
42 *Spodoptera frugiperda* ACR25157
71 *Mamestra configurata* ACR15970
100 *Lacanobia oleracea* CAA07611
100 *Heliothis virescens* AFO68321
Helicoverpa armigera CAA72949
68 *Spodoptera litura* AFM73832
79 *Helicoverpa armigera* CAA72956
Choristoneura fumiferana AAA84423
*Bombyx mori XP*_004934280
70 *Ostrinia nubilalis* AAX62034
59 *Plutella xylostella* AGR92345
0.05

图 3 苜蓿夜蛾丝氨酸蛋白酶与其他昆虫丝氨酸蛋白酶氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of serine protease from *Heliothis viriplaca* and other insects

分枝上数字代表自展值;标尺示遗传距离;拉丁文名字后为登录号。Numbers above branches are bootstrap values, the scale bar represents 0.05% nucleotide substitutions per site, and the GenBank accession numbers are behind the Latin names.

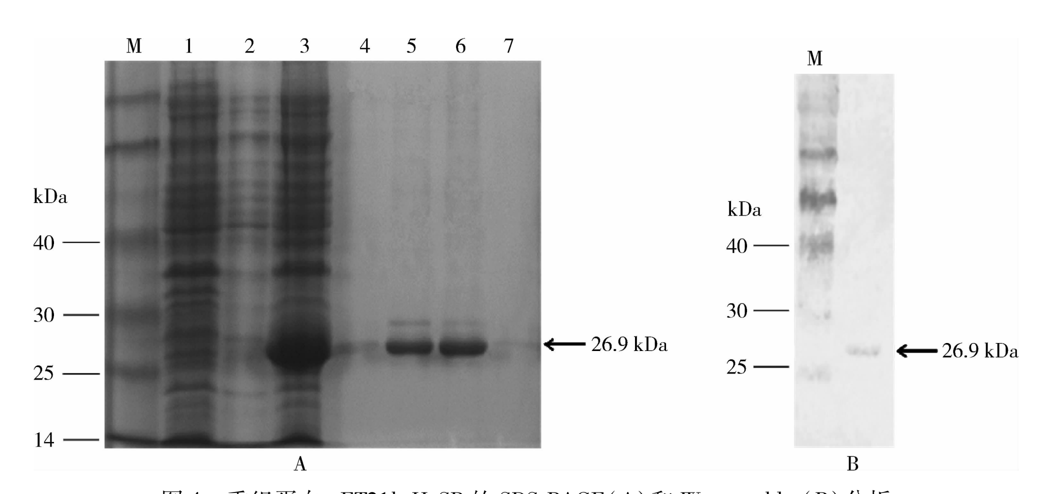


图 4 重组蛋白 pET21b-HvSP 的 SDS-PAGE(A)和 Western-blot(B)分析

Fig. 4 Analysis of recombinant protein pET21b-HvSP by SDS-PAGE (A) and Western-blot (B)

M: 蛋白分子质量标准 Protein molecular weight marker; 1: pET21b 空载体诱导产物 Expression product of pET21b induced by IPTG; 2: 诱导蛋白经超声破碎后的上清 Supernatant with ultrasonic disruption after the expression product was induced by IPTG; 3: 诱导蛋白经超声破碎后的沉淀 Deposit with ultrasonic disruption after the expression product was induced by IPTG; 4: 经 120 mmol/L 咪唑洗脱后的蛋白 Expression product eluted by 120 mmol/L imidazole; 5: 经 160 mmol/L 咪唑洗脱后的蛋白 Expression product eluted by 160 mmol/L imidazole; 6: 经 200 mmol/L 咪唑洗脱后的蛋白 Expression product eluted by 200 mmol/L imidazole; 7: 复性后的蛋白 Renatured recombinant protein.

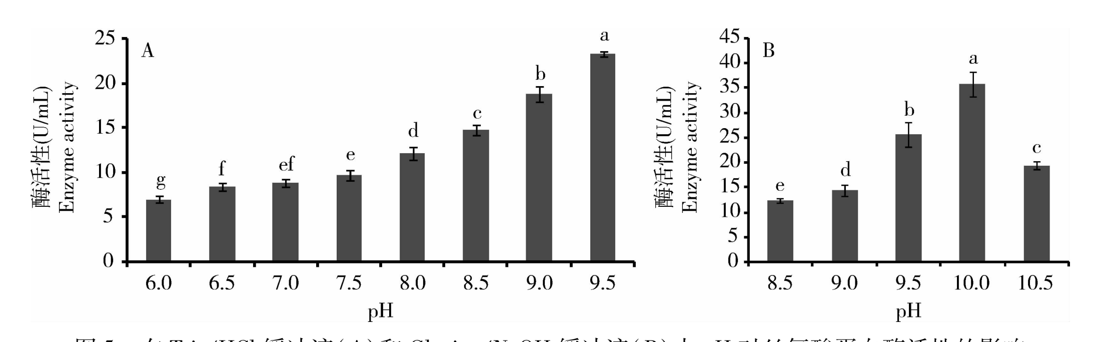


图 5　在 Tris/HCl 缓冲液(A)和 Glycine/NaOH 缓冲液(B)中 pH 对丝氨酸蛋白酶活性的影响

Fig. 5　Effect of pH value in Tris/HCl buffer (A) and Glycine/NaOH buffer (B) on serine protease activity

图中数据为平均值 ± 标准差；柱上不同小写字母表示酶活性在 0.05 水平上差异显著(Duncan 氏多重比较法检验)。Data in the figure are mean ± *SD*; different lowercase letters above bars indicate significant difference in activity at the 0.05 level (Duncan's multiple range test).

所示，在 Tris-HCl 和 Glycine-NaOH 缓冲液中的活性变化很相似，都随着 pH 的提高而增大。在 Tris-HCl 缓冲液中，酶的最适 pH 为 9.5，活性达到 23.24 U/mL(图 5：A)；在 Glycine-NaOH 缓冲液中，在 pH 为 10.0 时，活性达到最高，为 35.74 U/mL(图 5：B)。

3　讨论

丝氨酸蛋白酶是大部分鳞翅目、直翅目、双翅目、膜翅目以及某些鞘翅目昆虫肠道内的重要消化酶(Muharsini *et al.*, 2001；Broehan *et al.*, 2008, 2010；Bian *et al.*, 2008；Zhang *et al.*, 2010；Zhan *et al.*, 2011；刘海明等, 2012；Xie *et al.*, 2012；Zhu *et al.*, 2012)。一些研究证明，鳞翅目昆虫中肠丝氨酸蛋白酶在昆虫对 Bt 抗性中起减少毒素活性或增加毒素降解的作用，昆虫对 Bt 产生抗性有可能依赖于昆虫肠道中丝氨酸蛋白酶水平或类型的变化(Li *et al.*, 2004；Karumbaiah *et al.*, 2007；Yao *et al.*, 2012；Zhu *et al.*, 2012)。同时，有研究发现以胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶为主要蛋白消化酶的丝氨酸蛋白酶约占鳞翅目昆虫中肠总消化酶活性的 95% (Srinivasan *et al.*, 2006)，因此，研究丝氨酸蛋白酶对有效利用 Bt 防治鳞翅目害虫具有重要意义。

本研究首次从苜蓿夜蛾中肠克隆得到一条新的丝氨酸蛋白酶 cDNA 全序列，该基因翻译后的氨基酸序列具有明显的丝氨酸蛋白酶的典型特征，即氨基酸序列中具有保守的组氨酸(His)、天门冬氨酸(Asp)以及丝氨酸(Ser)残基组成酶活的催化中心三元件，这与已克隆得到的其他鳞翅目昆虫丝氨酸蛋白酶氨基酸序列拥有共同的酶活催化中心，但它们的分布位点存在一定差异。研究发现，N 端具有发夹状结构域(clip domain)的丝氨酸蛋白酶及其类似物参与到昆虫的酚氧化酶信号传导当中，参与昆虫体液免疫反应中的蛋白酶水解级联反应，与血淋巴黑化及抗菌肽合成等过程密切相关(刘碧朗等, 2011；朱洋铿等, 2011)，而在 HvSP 中未发现发夹结构域，这是因为 *HvSP* 是在中肠克隆的，推测 HvSP 与昆虫的消化有关，而与免疫反应无关，不参与到昆虫的酚氧化酶信号传导当中。

本研究在原核表达系统大肠杆菌中通过不同时间、不同温度的诱导，表达了大量的蛋白，经过 Western-blot 鉴定确定为目的蛋白。研究发现，在 37℃诱导 6 h 的效果最好，产生的重组蛋白较多。融合蛋白的可溶性分析实验证明为包涵体蛋白，未发现有丝氨酸蛋白酶活性，这可能是由于目的蛋白合成速度太快，没有足够的时间进行加工，致使中间体大量积累，容易形成包涵体沉淀；同时可能由于丝氨酸蛋白酶为真核蛋白，在原核系统中进行表达的时候，缺乏真核生物中翻译后修饰所需酶类，蛋白内部的 3 对二硫键不能正确配对(娜仁高娃等, 2011)。变性溶解得到的包涵体蛋白必须经过复性处理，才能使目标蛋白恢复其生物活性。复性操作是采用合理的方法使目标蛋白从变性的完全伸展状态恢复到正常的具有生物活性的折叠结构，同时去除还原剂，使二硫键正常形成的过程。尽管蛋白质复性一直是蛋白质纯化的一个难题，但是本研究中对得到的包涵体蛋白纯化后进行梯度透析复性，逐步降低透析液的浓度，进而控制变性剂的去除速度，还是得到了有活性的丝氨酸蛋白酶。除梯度透析复性外，柱上复性也是一种常用的方法。其中的凝胶过滤复性，通过低流速下，缓冲液中变性剂浓度逐渐降低，提供给变性的蛋白一个适宜的、组成连续变化的、可供选择的蛋白质折叠环境，且可以不断修正含有错误三维结构的折叠中间体(包义风等, 2012)。

因此,下一步可以尝试一下凝胶过滤复性,以获得活性更高的蛋白。

HvSP 推导出的氨基酸序列与 NCBI 上已知棉铃虫的类胰蛋白酶(GenBank 登录号: CAA72962)的氨基酸序列的一致性达 95%,可知 HvSP 也为胰蛋白酶类丝氨酸蛋白酶,而胰蛋白酶的底物是 BApNA,因此本研究中采用 BApNA 来检验复性后蛋白的活性。为适应鳞翅目昆虫肠道内的碱性环境,作为鳞翅目昆虫中肠主要蛋白消化酶的丝氨酸蛋白酶的最适 pH 均较高,但不同昆虫间也存在差异。为了提供可持续变化的酸碱环境,本研究在 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 6.0 ~ 9.5)和 0.1 mol/L Glycine-NaOH 缓冲液(pH 8.5 ~ 10.5)中检测酶的活性,结果显示:在 Glycine-NaOH 缓冲液中,pH 为 10.00 时活力达到最高,为 35.74 U/mL,因此,可看出本研究克隆得到的苜蓿夜蛾中肠丝氨酸蛋白酶为强碱性类胰蛋白酶,这与王琛柱等(1996)得到的实验结果中强碱性类胰蛋白酶的最适 pH 大致上相符合。

本实验建立的丝氨酸蛋白酶原核表达及蛋白纯化、复性技术,方法较为简单,表达量较高,纯化效果好,可在短期内获得具有生理活性的目的蛋白,为进一步研究该丝氨酸蛋白酶在苜蓿夜蛾体内的生理功能提供了理论依据。下一步将利用 RNA 干扰方法研究丝氨酸蛋白酶基因表达受到抑制后,苜蓿夜蛾中肠内相应丝氨酸蛋白酶含量变化对昆虫消化甚至生长发育及 Bt 作用效果的影响,为从分子生物学角度开展害虫防治奠定基础。

参考文献(References)

Bao YF, Ying LF, Jiang L, 2012. Research progress in renaturation of inclusion body protein. *Progress in Microbiology and Immunology*, 40(2): 84 - 87. [包义风, 应莲芳, 蒋琳, 2012. 包涵体蛋白复性技术研究进展. 微生物学免疫学进展, 40(2): 84 - 87]

Bian GW, Raikhel AS, Zhu JS, 2008. Characterization of a juvenile hormone-regulated chymotrypsin-like serine protease gene in *Aedes aegypti* mosquito. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(2): 190 - 200.

Brackney DE, Isoe J, IV BWC, Zamora J, Foy BD, Miesfeld RL, Olson KE, 2010. Expression profiling and comparative analyses of seven midgut serine proteases from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 56(7): 736 - 744.

Broehan G, Arakane Y, Beeman RW, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Merzendorfer H, 2010. Chymotrypsin-like peptidases from *Tribolium castaneum*: a role in molting revealed by RNA interference. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3): 274 - 283.

Broehan G, Kemper M, Driemeier D, Vogelpohl I, Merzendorfer H, 2008. Cloning and expression analysis of midgut chymotrypsin-like proteinases in the tobacco hornworm. *Journal of Insect Physiology*, 54(8): 1243 - 1252.

Choo YM, Qiu YL, Yoon HJ, Lee KY, Sohn HD, Jin BR, 2011. Enzymatic properties of a bee venom serine protease from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14(3): 249 - 251.

Christeller JT, Laing WA, Markwick NP, Burgess EPJ, 1992. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22(7): 735 - 746.

Coates BS, Hellmich RL, Lewis LC, 2006. Sequence variation in trypsin- and chymotrypsin-like cDNAs from the midgut of *Ostrinia nubilalis*: methods for allelic differentiation of candidate *Bacillus thuringiensis* resistance genes. *Insect Molecular Biology*, 15(1): 13 - 24.

Herrero S, Combes E, Oers MMV, Vlak JM, Maagd RA, Beekwilder J, 2005. Identification and recombinant expression of a novel chymotrypsin from *Spodoptera exigua*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(10): 1073 - 1082.

Johnston KA, Lee MJ, Gatehouse JA, Anstee JH, 1991. The partial purification and characterization of serine protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry*, 21(4): 389 - 397.

Karumbaiah L, Oppert B, Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, 2007. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146(1): 139 - 146.

Kotani E, Niwa T, Tokizane M, Suga K, Sugimura Y, Oda K, Mori H, Furusawa T, 1999. Cloning and sequence of a cDNA for a highly basic protease from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 8(2): 299 - 304.

Lehane SM, Assinder SJ, Lehane MJ, 1998. Cloning, sequencing, temporal expression and tissue-specificity of two serine proteases from the midgut of the blood-feeding fly *Stomoxys calcitrans*. *European Journal of Biochemistry*, 254(2): 290 - 296.

Li H, Oppert B, Higgins RA, Huang FN, Zhu KY, 2004. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(8): 753 - 762.

Liu BL, Li YX, Qi XW, Xiang ZH, He NJ, 2011. Molecular cloning and expression analysis of serine protease gene *BmHP21* in silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 37(3): 419 - 424. [刘碧朗, 李玉欣, 亓希武, 向仲怀, 何宁佳, 2011. 家蚕丝氨酸蛋白酶基因 *BmHP21* 的克隆及表达分析. 蚕业科学, 37(3): 419 - 424]

Liu HM, Zheng GL, Li CY, Zhou HX, 2012. Molecular cloning, sequence analysis and expression of serine protease cDNAs from the midgut of *Holotrichia oblita* (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(2): 147 - 155. [刘海明, 郑桂玲, 李长

友，周洪旭，2012. 华北大黑鳃金龟中肠丝氨酸蛋白酶 cDNA 克隆、序列分析及表达. 昆虫学报，55(2)：147 – 55]

Muharsini S, Dalrymple B, Vuocolo T, Hamilton S, Willadsen P, Wijffels G, 2001. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae of *Chrysomya bezziana*, the Old World screwworm fly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(11): 1029 – 1040.

Naren GW, Huhe BTE, Wang WL, 2011. Optimization on prokaryotic expression conditions of hypodermin genes. *Progress in Veterinary Medicine*, 32(3): 32 – 36. [娜仁高娃，呼和巴特尔，王文龙，2011. 牛皮蝇幼虫抗原基因原核表达条件的优化. 动物医学进展，32(3)：32 – 36]

Peterson AM, Fernando GJP, Wells MA, 1995. Purification, characterization and cDNA sequence of an alkaline chymotrypsin from the midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(7): 765 – 774.

Shi M, Zhu N, Yi Y, Chen XX, 2013. Four serine proteases cDNAs from the midgut of *Plutella xylostella* and their proteinase activity are influenced by endoparasitoid, *Cotesia vestalis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 83(2): 101 – 114.

Srinivasan A, Chougule NP, Giri AP, Gatehouse JA, Gupta VS, 2005. Podborer (*Helicoverpa armigera* Hübn.) does not show specific adaptations in gut proteinases to dietary *Cicer arietinum* Kunitz proteinase inhibitor. *Journal of Insect Physiology*, 51(11): 1268 – 1276.

Srinivasan A, Giri AP, Gupta VS, 2006. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11(1): 132 – 154.

Wang CZ, Qin JD, 1996. Partial characterization of protease activity in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae. *Acta Entomologica Sinica*, 39(1): 7 – 11. [王琛柱，钦俊德，1996. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定. 昆虫学报，39(1)：7 – 11]

Xie W, Lei YY, Fu W, Yang ZX, Zhu X, Guo ZJ, Wu QJ, Wang SL, Xu BY, Zhou XG, Zhang YJ, 2012. Tissue-specific transcriptome profiling of *Plutella xylostella* third instar larval midgut. *International Journal of Biological Sciences*, 8(8): 1142 – 1155.

Yao JX, Buschman LL, Oppert B, Khajuria C, Zhu KY, 2012. Characterization of cDNAs encoding serine proteases and their transcriptional responses to Cry1Ab protoxin in the gut of *Ostrinia nubilalis* larvae. *PLoS ONE*, 7(8): e44090.

Zhan QL, Zheng SC, Feng QL, Liu L, 2011. A midgut-specific chymotrypsin cDNA (*Slctlp*1) from *Spodoptera litura*: cloning, characterization, localization and expression analysis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 76(3): 130 – 143.

Zhang C, Zhou DH, Zheng SH, Liu L, Tao S, Yang L, Hu SN, Feng QL, 2010. A chymotrypsin-like serine protease cDNA involved in food protein digestion in the common cutworm, *Spodoptera litura*: cloning, characterization, developmental and induced expression patterns, and localization. *Journal of Insect Physiology*, 56(7): 788 – 799.

Zhu YC, Guo ZB, Abel C, 2012. Cloning eleven midgut trypsin cDNAs and evaluating the interaction of proteinase inhibitors with Cry1Ac against the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(2): 111 – 120.

Zhu YK, Fang Q, Hu C, Ye GY, 2011. Molecular cloning, characterization and expression profiling of a serine protease gene *Pr-SP*1 in *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(8): 859 – 868. [朱洋锃，方琦，胡萃，叶恭银，2011. 菜粉蝶丝氨酸蛋白酶基因 *Pr-SP*1 的克隆及其表达谱分析. 昆虫学报，54(8)：54(8)：859 – 868]

（责任编辑：赵利辉）